

DOI:10.13350/j.cjpb.230110

• 论著 •

去氢骆驼蓬碱对细粒棘球蚴的线粒体 Drp1、Mfn2 蛋白表达以及线粒体途径凋亡的影响*

赵美玲¹, 林玉霞¹, 吴彪¹, 麦尔比娅·阿布力米提¹, 巩月红^{2,3***}, 王建华^{2,3***}(1. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院药学部;
3. 新疆医科大学省部共建中亚高发病因与防治国家重点实验室)**【摘要】** 目的 探讨去氢骆驼蓬碱对细粒棘球蚴的线粒体 Drp1、Mfn2 蛋白表达以及线粒体途径凋亡的影响。 方法

无菌采集细粒棘球蚴, 随机分为空白对照组 4 个不同药物干预组。共干预 5 d, 采用亚甲蓝拒染试验观察细粒棘球蚴存活率, 采用活性氧试剂盒检测 ROS 生成水平, 结合 Mito-Tracker Red CMXRos、Mito-Tracker Green 荧光探针染色技术及 JC-1 染色技术综合检测线粒体膜电位和线粒体损伤情况, Western blot 法检测细粒棘球蚴融合分裂蛋白 Drp1、Mfn2、凋亡蛋白 Bcl-2、Cyt-C 表达水平变化。 结果 与空白对照组相比, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LABZSO 组、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LHM 组、12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mdivi-1 组、HM:Mdivi-1 组 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 细粒棘球蚴平均存活率显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与阳性药组相比, HM:Mdivi-1 组 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 细粒棘球蚴平均存活率显著降低 ($P < 0.05$)。ROS 试验显示, 各干预组平均荧光强度与空白对照组相比均增强 (均 $P < 0.01$)。Mito-Tracker Red CMXRos、Mito-Tracker Green 试验显示, 随着药物干预每组平均荧光强度均较空白对照组显著降低 (均 $P < 0.01$)。JC-1 染色显示, 阳性对照组和药物组绿色荧光增强。Western blot 显示, 各给药组 Drp1 蛋白水平与空白对照组相比均呈上调趋势 (均 $P < 0.01$), Mdivi-1 组呈下降趋势 ($P < 0.01$); Mfn2 蛋白均呈下调趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Cyt-C 蛋白均呈上调趋势 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Mdivi-1 组呈下降趋势 ($P < 0.01$); Bcl-2 蛋白均呈下调趋势 (均 $P < 0.01$), Mdivi-1 组呈上升趋势 ($P < 0.01$)。

结论 去氢骆驼蓬碱通过线粒体途径使细粒棘球蚴凋亡, 线粒体分裂蛋白 Drp1 和融合蛋白 Mfn2 的表达证实存在线粒体融合分裂机制。

【关键词】 去氢骆驼蓬碱; 细粒棘球蚴; 线粒体凋亡途径; 线粒体分裂融合**【中图分类号】** R383.33**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)01-0052-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):52-57.]

The effects of Harmine on mitochondrial Drp1 and Mfn2 protein expressions and of *Echinococcus granulosus*

ZHAO Mei-ling¹, LIN Yu-xia¹, WU Biao¹, MAIERBIYA Abulimiti¹, GONG Yue-hong^{2,3}, WANG Jian-hua^{2,3} (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Pharmacy, First Hospital Affiliated with Xinjiang Medical University; 3. Xinjiang Medical University Jointly Established the State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Diseases Highly Prevalent in Central Asia)*****【Abstract】** **Objective** To explore the effects of Harmine on the expression of mitochondrial Drp1 and Mfn2 proteins and the apoptosis of mitochondrial pathway in *Echinococcus granulosus*. **Methods** The *E. granulosus* was aseptically collected and randomly divided into the blank control group, the 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ABZSO group, the 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HM group, the 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mdivi-1 group, and the HM:Mdivi-1 group (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$:12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After intervention for 5d, the survival rate of *E. granulosus* was observed by methylene blue staining exclusion test. Reactive oxygen species assay kit was used to qualitatively observe and photograph ROS in the insect body under fluorescence microscope. Mito-tracker Red CMXRos and Mito-Tracker Green were used to observe the mitochondrial damage of *E. granulosus* under the fluorescence microscope and take photos. The active mitochondria in *E. granulosus* were observed under fluorescence microscope using Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (JC-1). After drug treatment, the total protein of *E. granulosus* was extracted, and the protein concentration was measured. Western blot was used to detect the protein expression levels of Drp1, Mfn2, Bcl-2 and Cyt-C in *E. granulosus* of each group. **Results** Compared with the blank control group, the average survival rate of *E. granulosus* in each administration group was significantly reduced ($P < 0.05$ * **【基金项目】** 新疆维吾尔自治区科学技术厅自然科学基金面上项目(No. 2020D01C240)。** **【通讯作者】** 王建华, E-mail: jhw716@163.com; 巩月红, E-mail: gongyh0602@126.com**【作者简介】** 赵美玲(1996-), 女, 陕西汉中, 在读硕士。主要研究方向: 抗包虫病机制研究。E-mail: 1482014532@qq.com

or $P < 0.01$). Compared with the positive drug group, the average survival rate of *E. granulosus* in the HM; Mdivi-1 group was significantly reduced ($P < 0.05$). ROS test showed that the average fluorescence intensity of each intervention group was higher than that of the blank control group (all $P < 0.01$). The Mito-Tracker Red CMXRos and Mito-Tracker Green experiments showed that the average fluorescence intensity of each group was significantly lower than that of the blank control group with the drug intervention (all $P < 0.01$). JC-1 staining showed that the green fluorescence of the positive control group and the medication group was enhanced. Western blot data showed that the protein levels of Drp1 in all administration groups were up-regulated compared with the blank control group (all $P < 0.01$), and Mdivi-1 group was down-regulated ($P < 0.01$). Mfn2 proteins tended to be down-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Cyt-C protein was up-regulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while Mdivi-1 group showed a downward trend ($P < 0.01$). Bcl-2 proteins were down-regulated (all $P < 0.01$), and Mdivi-1 group showed an up-down trend ($P < 0.01$). **Conclusion** Harmine can induce apoptosis of *E. granulosus* through mitochondrial pathway. that expression of mitochondrial divide protein Drp1 and fusion protein Mfn2 confirm the existence of mitochondrial fusion and division mechanism.

【Key words】 Harmine; *Echinococcus granulosus*; mitochondrial apoptotic pathway; mitochondrial fission and fusion

囊型包虫病(cystic echinococcosis, CE)是由细粒棘球蚴感染所致人兽共患寄生虫病^[2],呈全球性分布,我国至少有23个省(自治区)存在人感染囊型包虫病病例^[2]。该病病死率为2%~4%^[2],严重危害人体健康和经济发展。因此,包虫病防治是一个亟待解决的问题。

药物治疗一直是抗包虫病的重要手段,去氢骆驼蓬碱(Harmine, HM)是从新疆特色药材蒺藜科植物骆驼蓬种子中提取获得,属于三环 β -咪啉类生物碱^[3],具有抗包虫、抗肿瘤、抗氧化等活性作用^[4-5],以及中枢神经毒性作用。已经证实HM具有良好的抗包虫疗效,但存在HM作用靶点不明确,机制不清晰等问题。因此明确HM作用靶点与机制是提高药效的关键。舒本水等^[6]报道去氢骆驼蓬碱通过激活内源性凋亡途径和抑制DNA拓扑异构酶I活性诱导草地贪夜蛾Sf9细胞凋亡,其中内在的线粒体和溶酶体凋亡途径被激活。巩月红等^[7]研究发现, HM干预虫体过程中Caspase-3被激活,此途径可能参与细粒棘球蚴的凋亡。其衍生物DH-330作用虫体后Caspase-3酶活性和Cyt-C释放量显著增加,表明线粒体凋亡通路可能参与诱导细粒棘球蚴凋亡过程^[8]。因此,线粒体途径是一个极具潜力的治疗包虫病的药物靶点。

线粒体途径的细胞凋亡启动后,会引起融合/分裂运动失衡,线粒体网络状结构被破坏,细胞色素C等促凋亡因子被释放^[9],可能通过干扰线粒体动力学平衡影响线粒体能量代谢,最终导致各脏器损伤。线粒体融合分裂平衡失衡,会引起帕金森^[10]、阿尔兹海默症^[11]等中枢神经系统疾病高发。HM具有中枢神经毒性作用,该作用可能会影响虫体线粒体融合分裂机制。

本研究拟通过荧光法检测细粒棘球蚴ROS活性氧生成水平,线粒体细粒棘球蚴中的活性线粒体,以及线粒体膜电位水平,Western blot法检测细粒棘球蚴

Drp1、Mfn2、Bcl-2、Cyt-C蛋白表达水平的变化,探索HM对细粒棘球蚴线粒体融合分裂蛋白Drp1、Mfn2表达以及线粒体途径凋亡的影响,为抗囊型包虫病拓展新靶点提供新思路,完善抗包虫病药物促凋亡机制。

材料与方 法

1 材 料

1.1 仪器 SW-CJ-IFD型超净操作台,购自苏州净化设备有限公司;倒置荧光显微镜为日本Nikon公司产品;Varioskan Flash型酶标仪和CO₂恒温培养箱为美国Thermo公司产品;冷冻混合球磨仪为德国Retsch公司产品;电泳仪及凝胶成像仪为美国Bio Rad公司产品。

1.2 试剂 胎牛血清和青链霉素溶液均购自美国Gibco公司;RPMI1640培养基购于美国Hyclone公司;二甲基亚砜(DMSO),蛋白酶抑制剂PMSF,线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)以及活性氧检测试剂盒(Reactive oxygen species assay kit)购于北京索莱宝科技有限公司;Mito-Tracker Red CMXRos(线粒体红色荧光探针)和Mito-Tracker Green(线粒体绿色荧光探针)购于碧云天生物有限公司;去氢骆驼蓬碱(Harmine, HM)由新疆医科大学第一附属医院药研室提供;Mdivi-1(Mitochondrial division inhibitor 1)购于美国MCE(MedChemexpress)公司;兔抗Drp1和Mfn 2购于英国Abcam公司;鼠抗 β -actin,山羊抗兔IgG/HRP及山羊抗鼠IgG/HRP购于北京Bioss公司;12.5%SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒购于北京博泰斯生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒, RIPA蛋白裂解液及ECL发光液购于美国Thermo公司。

2 方 法

2.1 细粒棘球蚴的采集与培养 于新疆乌鲁木齐华凌屠宰市场所购自然感染细粒棘球蚴的绵羊肝脏中,

无菌操作取出羊肝包囊中的内囊,抽取囊液,剪碎内囊,反复用灭菌生理盐水冲洗,沉淀后收集细粒棘球蚴。获得的细粒棘球蚴用胃蛋白酶消化处理,使用滤网过滤除去杂质,用含双抗(青、链霉素 10 mL)生理盐水(1 000 mL)反复多次清洗后,转入培养瓶加入培养基,置 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱培养。培养基为 10% RPMI-1640,含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(青霉素+链霉素)。

2.2 亚甲蓝拒染试验 取培养的细粒棘球蚴按每孔 2 000 个接种于 48 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后进行试验。试验设空白对照组、25 μg/mL LABZSO 组、25 μg/mL LHM 组、12.5 μg/mL Mdivi-1 组和 HM:Mdivi-1 组(25 μg/mL :12.5 μg/mL)共 5 组。分别在药物干预 24、48、72、96、120 h 时取细粒棘球蚴用 0.1% 亚甲蓝染色、制片,倒置显微镜下观察其形态及活力。活力旺盛的细粒棘球蚴不着色,活力下降或死亡的细粒棘球蚴呈蓝色。记录死亡细粒棘球蚴数及细粒棘球蚴总数,计算细粒棘球蚴存活率。细粒棘球蚴存活率(%)=[(细粒棘球蚴总数-死亡细粒棘球蚴数)/细粒棘球蚴的总数]×100%。

2.3 药物干预细粒棘球蚴的活性氧检测 取培养的细粒棘球蚴按每孔 1 000 个接种于 96 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后进行试验。试验设空白对照组、25 μg/mL LHM 组、12.5 μg/mL Mdivi-1 组和 HM:Mdivi-1 组(25 μg/mL :12.5 μg/mL)共 4 组。收集细粒棘球蚴,用 DCFH-DA(10 μmol/L)在 37 °C 下避光孵育 30 min, PBS 洗 3 次,荧光显微镜下对虫体内活性氧进行定性观察并拍照。使用 Image J 软件分析荧光图片的平均荧光强度。

2.4 药物干预后细粒棘球蚴活性线粒体定位检测 取培养的细粒棘球蚴按每孔 1 000 个接种于 96 孔板中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后进行试验。试验设空白对照组、25 μg/mL LHM 组、12.5 μg/mL Mdivi-1 组和 HM:Mdivi-1 组(25 μg/mL :12.5 μg/mL)共 4 组。使用 Mito-Tracker Red CMXRos 和 Mito-Tracker Green 探针观察细粒棘球蚴线粒体的损伤情况。线粒体示踪剂呈绿色,通常在水溶液中不发荧光,而在线粒体的脂质环境中积累后会发出荧光。细粒棘球蚴在培养板药物干预 24 h 后加入 Mito-Tracker Red CMXRos 工作液,37 °C 孵育 15~30 min;加入 Mito-Tracker Green 工作液,37 °C 孵育 15~45 min;去除工作液,加入 37 °C 预温育的新鲜细胞培养液,用荧光显微镜进行观察,使用 Image J 软件分析荧光图片的平均荧光强度。

2.5 药物干预细粒棘球蚴线粒体膜电位检测 取培养的细粒棘球蚴按每孔 1 000 个接种于 96 孔板中,置

37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后进行试验。试验设空白对照组、25 μg/mL LHM 组、12.5 μg/mL Mdivi-1 组和 HM:Mdivi-1 (25 μg/mL :12.5 μg/mL) 组共 4 组。加入 0.5 mL JC-1 染色工作液,颠倒数次混匀,然后置培养箱中 37 °C 孵育 20 min,4 °C、600 g 离心 3~4 min,弃上清,用 JC-1 染色缓冲液(1×)洗涤沉淀 2 次;加入 1 mL JC-1 染色缓冲液(1×)重悬细胞,4 °C、600 g 离心 3~4 min,弃上清,虫体沉淀反复洗涤 2 次,再用适量 JC-1 染色缓冲液(1×)重悬,采用荧光显微镜观察并拍照。

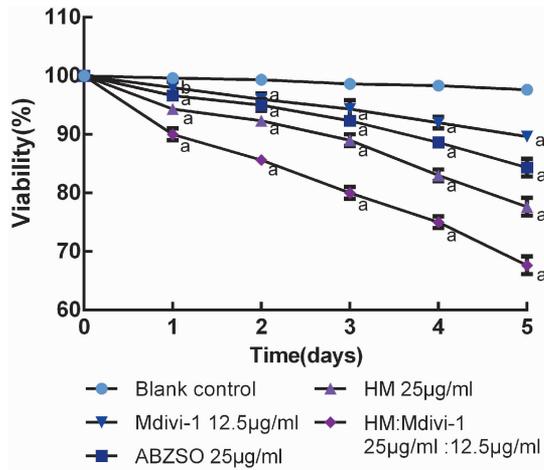
2.6 药物干预细粒棘球蚴凋亡蛋白及融合分裂蛋白表达水平检测 药物处理后提取细粒棘球蚴总蛋白质,将各组样品置于组织球磨机中进行研磨,频率为 26 次/s,每次 1.5 min,重复两次,取上清,用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取蛋白样品约 5~10 μg,经 12.5% SDS-PAGE 电泳(浓缩胶 80 V,30 min,分离胶 120 V,1 h)后冰上湿法转膜(90 V,1 h),然后用含 0.1% 吐温 20 的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,1× TBST(0.05% 吐温 20)溶液洗膜 3 次,5 min/次;将各条带的 NC 膜放入对应一抗 Drp1(1 : 1000)、Mfn 2(1 : 1000)、Cyt-C(1 : 2000)、Bcl-2(1 : 2000)、β-actin(1 : 1 000)溶液中 4 °C 孵育过夜,1× TBST 液洗膜 3 次,10 min/次;加入相应二抗,室温孵育 1 h,1× TBST 液洗 3 次,10 min/次,用 ECL 化学发光检测试剂显示蛋白质信号,Image J 软件分析各条带灰度值,以 β-actin 为内参对照,根据目的蛋白/内参的灰度值比值,计算各蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。计量资料的组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad Prism 6.0 对数据进行可视化。

结果

1 药物对细粒棘球蚴原头蚴活力的影响

如图 1 显示,与空白对照组相比 25 μg/mL LABZSO 组、25 μg/mL LHM 组、HM:Mdivi-1 (25 μg/mL :12.5 μg/mL) 组细粒棘球蚴原头蚴平均存活率显著降低(F 值分别为 6.811、8.358、11.527,均 $P < 0.05$);12.5 μg/mL Mdivi-1 组平均存活率显著降低(F 值分别为 6.085,均 $P < 0.01$)。第 1 d 与 5 d 相比,空白组细粒棘球蚴原头蚴平均存活率差异有统计学意义($P < 0.05$),LABZSO 组、HM 组、Mdivi-1 组以及 HM:Mdivi-1 组差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。



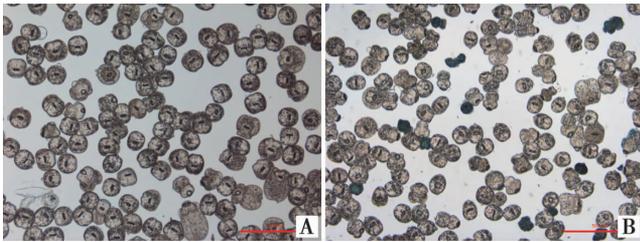
注:与空白对照组比较, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$

图 1 不同药物作用细粒棘球蚴存活率 (%)

Notes: Compared with blank control group, ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.05$.

Fig. 1 Viability of *E. granulosus* after drug treatment at different concentration (%)

图 2A 显示, 药物体外干预后空白对照组细粒棘球蚴活性良好, 未被染成蓝色, 虫体完整头钩未脱落; 图 2B 显示 HM 干预组、ABZSO 组明显虫体外侧起泡, 死亡虫体蓝染, 活性降低。HM 联合 Mdivi-1 组呈蓝色且虫体团缩, 头钩脱落, 死亡虫体蓝染, 活性显著降低。



A 空白对照组细粒棘球蚴 B 药物干预组细粒棘球蚴

图 2 药物作用后的细粒棘球蚴形态 (40×)

A *E. granulosus* of blank control group B *E. granulosus* in drug intervention group

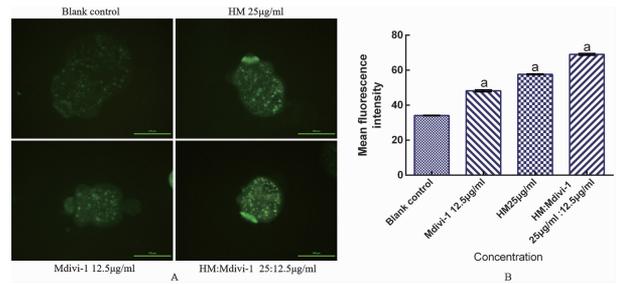
Fig. 2 Morphology of *E. granulosus* after of drug action (40×)

2 药物对原头蚴活性氧 ROS 的影响

如图 3A 所示, DCF 标记线粒体 ROS (呈绿色荧光), HM 干预组、Mdivi-1 干预组和 Mdivi-1 联合 HM 干预组均可见绿色荧光, 平均荧光强度与空白对照组比较显著增强 (F 值分别为 1844.741、19335.966、12255.250, 均 $P < 0.01$) (图 3B)。

3 药物对原头蚴体内线粒体活性的影响

图 4A 为红色探针检测结果。与空白对照组相比, 细粒棘球蚴经不同药物干预后平均荧光强度均下降 (F 值分别为 90.092、1591.391、3890.217, 均 $P < 0.01$) (图 5A)。



注: a 与空白对照组比较, $P < 0.01$

图 3 药物作用细粒棘球蚴 ROS 荧光图 (200×) (A) 和药物作用细粒棘球蚴 ROS 平均荧光强度直方图 (B)

Notes: a Compared with blank control group, $P < 0.01$.

Fig. 3 ROS fluorescence intensity of *E. granulosus* after of drug action (200×) (A) and Mean fluorescence intensity of *E. granulosus* after of drug action (B)

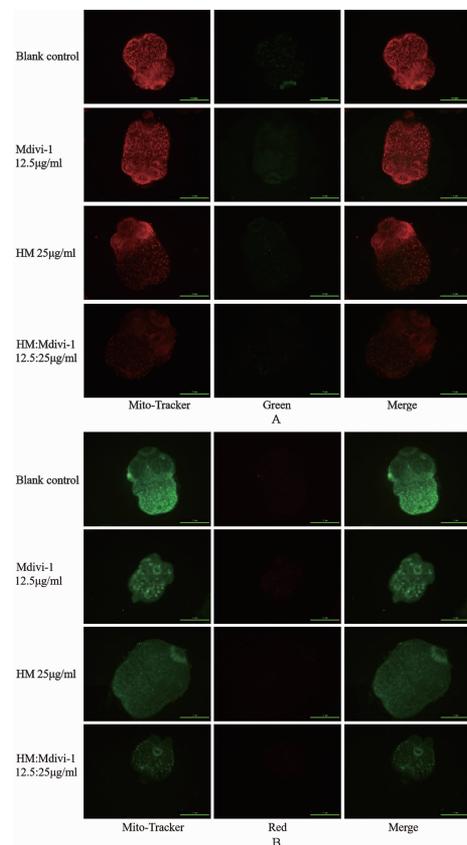


图 4 药物作用细粒棘球蚴线粒体红色荧光探针 (A) 和线粒体绿色荧光探针 (B) 图 (200×)

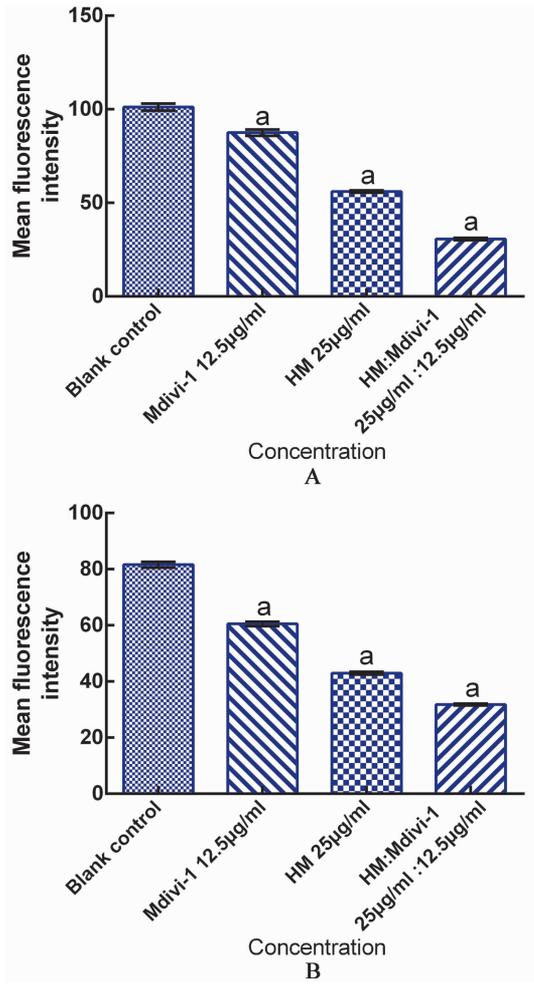
Fig. 4 Mito-Tracker Red CMXRos (A) and Mito-Tracker Green (B) of *E. granulosus* after of drug action (200×)

图 4B 为绿色探针检测结果。与空白对照组相比, 细粒棘球蚴经不同药物干预后平均荧光强度均下降 (F 值分别为 762.309、3429.013 和 6265.384, 均 $P < 0.01$) (图 5B)。

4 药物对原头蚴体内线粒体膜电位水平的影响

图 6 所示为线粒体膜电位, 正常膜电位为红色荧光, 线粒体膜电位降低时产生绿色荧光。空白组出现红色荧光说明线粒体膜电位正常, 虫体状态正常。阳

性对照组和药物组红色荧光减弱,绿色荧光增强。



A 红色荧光探针检测的荧光强度 B 绿色荧光探针检测的荧光强度 a 与空白对照组比较, $P < 0.01$

图 5 药物干预后的细粒棘球蚴平均荧光强度

A Fluorescence intensity of red fluorescent probe detection B Fluorescence intensity of green fluorescent probe detection Notes: a Compared with blank control group, $P < 0.01$.

Fig. 5 Mean fluorescence intensity of *E. granulosus* after of drug action

5 药物对线粒体融合分裂机制蛋白表达的影响

图 7A 为各组细粒棘球蚴 Drp1、Mfn2 蛋白表达水平。与空白对照组相比, HM 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM:Mdivi-1 组的 Drp1 蛋白水平均呈上调趋势 (F 值分别为 141.553、1156.387、2583.066, 均 $P < 0.01$), Mdivi-1 组呈下降趋势 ($F = 391.296, P < 0.01$) (图 7B); Mdivi-1 组、HM 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 HM:Mdivi-1 组的 Mfn2 蛋白水平均呈下调趋势 (F 值分别为 14.981、114.012、260.965、291.467, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 7C)。

6 药物对线粒体途径凋亡蛋白表达的影响

图 8A 为各组细粒棘球蚴 Bcl-2、Cyt-C 蛋白表达情况。与空白对照组相比, HM 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 HM:Mdivi-1 组 Bcl-2 蛋白水平均呈下调趋势 (F 值分别为 6794.065、12597.028、6731.737, 均

$P < 0.01$), Mdivi-1 组呈上降趋势 ($F = 697.966, P < 0.01$) (图 8B); HM 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组、HM:Mdivi-1 组 Cyt-C 蛋白水平均呈上调趋势 (F 值分别为 13.258、893.397、21116.469, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Mdivi-1 组呈下降趋势 ($F = 84.397, P < 0.01$) (图 8C)。

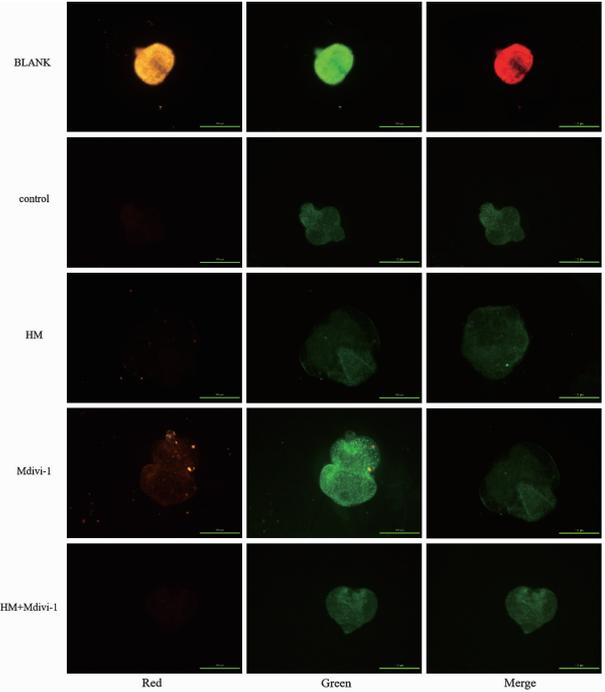
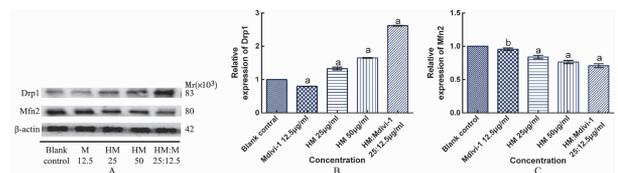


图 6 药物干预后的细粒棘球蚴线粒体 JC-1 荧光图 (200 \times)
Fig. 6 JC-1 of *E. granulosus* after of drug action (200 \times)



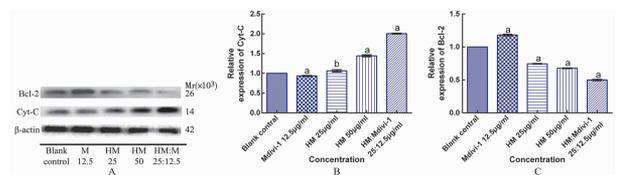
注:与空白对照组比较, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$ 。

图 7 Western blot 检测 Drp1、Mfn2 蛋白的表达 (A)

及 Drp1 (B)、Mfn2 (C) 蛋白表达的差异分析

Notes: Compared with blank control group, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$.

Fig. 7 Western blot was used to detect the expression of Drp1 and Mfn2 (A) and the difference between expression levels of Drp1 (B) and Mfn2 (C)



注:与空白对照组比较, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$ 。

图 8 Western blot 检测 Cyt-C、Bcl-2 蛋白表达 (A) 及 Cyt-C (B)、Bcl-2 (C) 蛋白表达水平差异分析

Notes: Compared with blank control group, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$.

Fig. 8 Western blot was used to detect the expression of Cyt-C and Bcl-2 (A) and the difference between expression levels of Cyt-C (B) and Bcl-2 (C)

讨 论

包虫病危害大,影响范围广,威胁畜牧业的发展,造成严重经济损失。包虫病的防治是一个亟待解决的问题。天然药物成分 HM 具有杀虫、抑菌作用,具有良好的抗囊型包虫病作用。但 HM 存在作用靶点不明确、机制不清晰、神经毒性机制不明确等问题。因此,探究 HM 的抗包虫机制,寻找作用靶点是提高 HM 药效的关键环节。

亚甲蓝试验结果显示, HM、ABZSO 作用细粒棘球蚴后虫体外侧起泡,活性降低,而 Mdivi-1 作用后的虫体活性降低不明显,联合药物组虫体活性显著降低。表明线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 能够抑制线粒体分裂抑制细胞凋亡,以药物联合的效果更显著,可能是 Mdivi-1 无法挽救因 HM 处理过的细胞凋亡, Mdivi-1 进一步增强了 HM 诱导的线粒体片段化,线粒体功能障碍和细胞凋亡。药物作用后的细粒棘球蚴存活率均较高,可能与所用细粒棘球蚴的活力有关。

ROS 试验显示 HM 组和联合药物组虫体荧光显著增强,但 Mdivi-1 组荧光较弱。Mito-Tracker Red CMXRos, Mito-Tracker Green 探针染色后,药物干预组虫体平均荧光强度均有所下降, Mdivi-1 组虫体荧光较强。JC-1 染色试验中空白组虫体红色荧光较强,阳性对照组和药物组红色荧光减弱而绿色荧光增强,但 Mdivi-1 组红色荧光较强。表明药物组虫体发生了线粒体膜电位去极化,发生线粒体损伤,且不能维持正常线粒体的形态功能,证实线粒体途径凋亡确实存在,参与导致虫体凋亡。Mdivi-1 抑制线粒体分裂,未造成线粒体损伤,膜电位基本不变。

线粒体融合分裂为动态过程,失衡时导致线粒体损伤和片段化,伴随细胞凋亡发生,虫体凋亡过程也可能存在融合分裂机制。研究线粒体途径中融合分裂机制对虫体的影响,考察其能否成为 HM 治疗包虫病的新靶点,可为治疗包虫病提供新思路。舒本水等^[6]报道 HM 可诱导 Sf9 细胞凋亡,其中内在的线粒体和溶酶体凋亡途径被激活。本研究结果表明, HM 诱导激活线粒体凋亡途径参与细粒棘球蚴凋亡。细粒棘球蚴线粒体凋亡途径抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,促凋亡蛋白 Cyt-C 表达水平上调。HM 浓度增加凋亡作用越强,联合药物组凋亡作用更强。研究表明,多房棘球蚴感染在体内外均会引起线粒体动力学改变,并且以线粒体分裂为主^[12]。本实验结果表明,细粒棘球蚴存在线粒体融合分裂机制。药物组细粒棘球蚴线粒体融合分裂机制融合蛋白 Mfn2 表达水平平均下调,分裂蛋白 Drp1 表达水平平均上调; HM 药物浓度增加促凋亡作用越强,以联合药物组凋亡作用最强。Mdivi-1 组 Bcl-2、

Mfn2 蛋白表达水平较高, Drp1、Cyt-C 蛋白表达水平较低,可能是线粒体分裂抑制剂 (Mdivi-1) 会抑制 Drp1 分裂。且 Mfn2 表达增加,线粒体分裂减少,抑制 Cyt-C 的释放,降低 Bax 的活性^[13]。Bcl-2 表达增加,最终抑制细胞凋亡。

本实验验证了 HM 治疗包虫病过程中存在的线粒体凋亡通路,且存在线粒体融合分裂机制。HM 参与线粒体凋亡途径,线粒体膜电位发生去极化,虫体 ROS 水平升高,造成线粒体损伤,线粒体功能形态发生变化导致质量下降,细粒棘球蚴发生凋亡。Mdivi-1 可进一步增强 HM 诱导的线粒体片段化,加剧虫体凋亡。线粒体凋亡蛋白 Cyt-C、Bcl-2 和融合分裂机制蛋白 Mfn2、Drp1 可作为 HM 治疗包虫病的新靶点,为抗包虫病新药的研制奠定了理论基础。

【参考文献】

- [1] 尚琳琳,李玲慧,李静,等. 细粒棘球蚴感染对小鼠脾脏 NKT 细胞免疫功能的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(08): 902-908.
- [2] 魏玉环,胡媛,曹建平. 抗细粒棘球蚴疫苗的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(1): 97-101.
- [3] 国家药典委员会. 卫生部药品标准·维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1998: 80.
- [4] Kadayifci FZ, Zheng S, Pan YX. Molecular Mechanisms Underlying the Link between Diet and DNA Methylation[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 4055.
- [5] Miousse IR, Kutanzi KR, Koturbash I. Effects of ionizing radiation on DNA methylation: from experimental biology to clinical applications[J]. Int J Radiat Biol, 2017, 93(5): 457-469.
- [6] Shu B, Zhang J, Jiang Z, et al. Harmine induced apoptosis in Spodoptera frugiperda Sf9 cells by activating the endogenous apoptotic pathways and inhibiting DNA topoisomerase I activity [J]. Pestic Biochem Physiol, 2019(155): 26-35.
- [7] 巩月红,高惠静,卢帅,等. 去氢骆驼蓬碱体外诱导细粒棘球蚴原头节凋亡过程中 caspase-3 及抗氧化酶活性检测分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(11): 1207-1210.
- [8] 王春芳,巩月红,王建华,等去氢骆驼蓬碱衍生物 DH-330 体外对细粒棘球蚴线粒体凋亡通路中 Cyt-C 和 Caspase-3 的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1370-1374, 1385.
- [9] 赵丽,周巧霞,王拴,等. 线粒体分裂和融合相关蛋白质的研究进展[J]. 生理学报, 2018, 70(4): 424-432.
- [10] Zhang X, Huang W, Fan Y, et al. Role of GTPases in the regulation of mitochondrial dynamics in Parkinson's disease[J]. Exp Cell Res, 2019, 382(1): 111460.
- [11] 于罡,刘鑫,何蔚. 阿尔茨海默病的线粒体损伤机制[J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(4): 390-395.
- [12] 杜秋沛. 肝泡型包虫病中线粒体动力学对巨噬细胞极化的影响[D]. 青海大学, 2021.
- [13] 胡新新,高福花,胡晓艳,等. 线粒体动力学与心血管疾病联系的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(7): 861-868.

【收稿日期】 2022-09-15 【修回日期】 2022-11-25